



(19) RU⁽¹¹⁾ 2 130 069⁽¹³⁾ C1

(51) МПК⁶ C 12 N 7/00, 7/02, 11/02, A 61
K 39/44

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 97103958/13, 14.03.1997

(46) Дата публикации: 10.05.1999

(56) Ссылки: RU 2057804 C1, 22.12.93. RU 2016897 C1, 12.09.91. RU 2051173, 09.01.92. PCT 8908701 A1, 21.09.89. Асташкина О.В. Получение модифицированных химических волокон-аффинных сорбентов для вирусологии - Л., 1991, с.150. Применение криогелей поливинилового спирта в биотехнологии. Обзор литературных данных, Биотехнология, N 4, 1992, с.5 - 14.

(98) Адрес для переписки:
117813, Москва, ГСП-1 ул.Вавилова, 28, ИНЭОС РАН, патентный отдел

(71) Заявитель:
Институт элементоорганических соединений
им.А.Н.Несмеянова РАН

(72) Изобретатель: Лозинский В.И.,
Плиева Ф.М., Исаева Е.И., Зубов А.Л.

(73) Патентообладатель:
Институт элементоорганических соединений
им.А.Н.Несмеянова РАН

(54) СПОСОБ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ ВИРУСА

(57) Реферат:

Изобретение относится к прикладной вирусологии, конкретно к процессам выделения, очистки, модификации вирусов и вирусных препаратов, т.е. к процессам, связанным с концентрированием вирусов. При концентрировании вируса путем его связывания биоаффинным сорбентом, содержащим антитела к вирусу, иммобилизованные на полимерной основе, промывки и последующей десорбции, в качестве полимерной основы биоаффинного сорбента используют криогель поливинилового спирта с размером пор 0,04 -

2,0 мкм. Кроме того, биоаффинный сорбент может, согласно данному изобретению, содержать наряду с антителами иммобилизованные ферменты, модифицирующие вирус. Предлагаемый способ обладает преимуществами по сравнению с аналогами и прототипом; а) повышена эффективность способа; б) повышена универсальность. Изобретение может быть использовано как в научных исследованиях, так и при производстве вакцин и диагностикумов, а также в медицинской практике. 1 з.п. ф-лы.

RU 2 130 069 C1

RU 2 130 069 C1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 130 069** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁶ **C 12 N 7/00, 7/02, 11/02, A**
61 K 39/44

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 97103958/13, 14.03.1997

(46) Date of publication: 10.05.1999

(98) Mail address:
117813, Moskva, GSP-1 ul.Vavilova, 28,
INEhOS RAN, patentnyj otdel

(71) Applicant:
Institut ehlementoorganicheskikh soedinenij
im.A.N.Nesmejanova RAN

(72) Inventor: Lozinskij V.I.,
Plieva F.M., Isaeva E.I., Zubov A.L.

(73) Proprietor:
Institut ehlementoorganicheskikh soedinenij
im.A.N.Nesmejanova RAN

(54) **METHOD OF VIRUS CONCENTRATING**

(57) **Abstract:**

FIELD: applied virology. SUBSTANCE: invention relates to methods of isolation, purification and modification of viruses and viral preparations i. e. to processes associated with virus concentrating. Method involves virus binding with bioaffinity sorbent containing antibodies raised to virus and immobilized on polymer base, washing out and desorption. Polymer base of bioaffinity sorbent is cryogel of polyvinyl alcohol (pore size is 0.04-2.0 mcm). Also,

bioaffinity sorbent can contain both immobilized enzymes modifying virus and antibodies. Proposed method shows the following advantages as compared with analogs and prototype: a) enhanced effectiveness of method; b) increased universality. Invention can be used both in scientific investigations and in production of vaccines and diagnostics and in medicine practice also. EFFECT: improved method of virus concentrating. 2 cl, 7 ex

RU 2 130 069 C1

RU 2 130 069 C1

Изобретение относится к прикладной вирусологии, конкретно к процессам выделения, очистки, идентификации, модификации вирусов и вирусных препаратов, т. е. к процессам, связанным с концентрированием вирусов. Изобретение может быть использовано как в научных исследованиях, так и при производстве вакцин и диагностикумов, а также в медицинской практике.

Известными методами концентрирования вирусных частиц в современной вирусологии являются многоступенчатые операции длительного высокоскоростного центрифугирования в градиенте плотности сахарозы или глицерина, а также зонного электрофореза и др. [1], кроме того используется концентрирование вирусов с помощью биоаффинных сорбентов, содержащих иммобилизованные антитела к вирусу [2]. Последний подход характеризуется большей эффективностью и технологическими удобствами.

Так, известен способ биоаффинной очистки вируса кори, где используют носитель, содержащий иммуноглобулины сыворотки крови обезьян, ковалентно пришитые к поверхности модифицированных стеклянных бусинок [3]. Способ включает пропускание вирусосодержащей жидкости через хроматографическую колонку, заполненную биоаффинным сорбентом с иммуноглобулинами, ковалентно-пришитыми к стеклянному носителю, с последующей промывкой колонки 0,14M раствором NaCl и элюированием вируса 0,1M глициновым буфером при pH 2,3.

Недостатками такого способа является низкая биоспецифическая емкость используемого носителя (работает только поверхность стеклянных гранул), неспецифическая адсорбция стеклом посторонних примесей и хрупкость, характерные для стеклянных носителей вообще.

Известен способ биоаффинной очистки вирусов разных размеров, где для очистки вируса используется силикагель с контролируемыми размерами пор (0,05 - 1,0 мкм) с привитыми аффинными лигандами [4]. Способ состоит из аналогичных операций хроматографической очистки целевого продукта, что и в предыдущем случае, только для промывания используют 0,1M Na-фосфатный буфер (pH 7,0), а для элюирования применяют 0,05M Na-цитратный буфер (pH 3,0).

Недостатками этого способа являются сложность получения иммуносорбента, связанная с многостадийной схемой модификации неорганического носителя, а также характерная для таких материалов хрупкость. Кроме того, в рабочих жидкостях даже со слабощелочной реакцией среды (pH 7,5-8,5) кремнеземные матрицы гидролитически нестабильны, что приводит к растворению активной поверхности и прогрессирующему снижению биоспецифической емкости.

Наиболее близким к предлагаемому по технической сущности является выбранный в качестве прототипа способ очистки вируса сумчатой болезни цыплят путем его сорбционного концентрирования при пропускании вирусосодержащих суспензий

через колонку с иммуносорбентом, представляющим собой нерастворимый носитель - гранулированный агарозный гель (коммерческое название - сефароза-4В), к которому после активации бромцианом ковалентно пришиты иммуноглобулины [5]. Такой биоаффинный сорбент используют для очистки не очень крупных вирусов, размеры которых ее превышают 0,08 мкм.

Однако указанный способ концентрирования вируса малоэффективен при работе с крупными (0,1-0,5 мкм) вирусами. Кроме того, гранулированные агарозные гели, в частности сефароза, имеют высокую стоимость и поэтому не могут найти крупномасштабного применения. Бромциан, используемый для активации данного носителя является высокотоксичным соединением, работа с ним представляет опасность для персонала.

Задача предлагаемого изобретения - разработка эффективного, универсального и технологически упрощенного способа концентрирования различных вирусов, в том числе и самых крупных вирусов с размером частиц до 0,5 мкм.

Решение этой задачи достигается тем, что при концентрировании вируса путем его связывания биоаффинным сорбентом, содержащим антитела к вирусу, иммобилизованные на полимерной основе, промывку и последующую десорбцию, в качестве полимерной основы биоаффинного сорбента используют криогель поливинилового спирта с размером пор 0,04 - 2,0 мкм. Кроме того, биоаффинный сорбент может, согласно данному изобретению, содержать, наряду с антителами, иммобилизованные ферменты, модифицирующие вирус.

Оказалось, что выбор криогеля поливинилового спирта (ПВС) в качестве полимерной основы биоаффинного сорбента обеспечивает возможность технологического упрощения способа концентрирования вируса, повышение эффективности способа в целом, его универсальности, в том числе и в отношении самых крупных вирусов с размером частиц до 0,5 мкм.

Весьма важными свойствами криогелей ПВС является их биосовместимость, отсутствие токсичности, а также его доступностью и относительная дешевизна. Криогели ПВС образуются в результате замораживания концентрированных водных растворов ПВС, их выдерживания в замороженном состоянии в течение определенного времени и последующего оттаивания [6]. Сформированный таким образом макропористый криогель устойчив при температурах до 80-85°C и имеет температуру плавления 80-100 °C. Он обладает выраженной макропористостью [6], т.е. отвечает одному из основных требований, предъявляемых к носителям, предназначенным для работы с вирусами. Согласно предлагаемому изобретению в качестве полимерной основы биоаффинного сорбента предусматривается использование криогеля ПВС, имеющего поры размером 0,05-2,0 мкм. Такие поры обеспечивают свободное проникновение даже самых крупных вирусов внутрь гранул носителя, т.е. в связывании с вирусами участвуют аффинные лиганды всего объема носителя.

Кроме того, в противоположность хрупким макропористым неорганическим матрицам (макропористые стекла, кремнеземы, диатомит и др.) криогели ПВС являются нехрупкими вязкоупругими физическими телами, мало подверженными абразивному износу даже при интенсивном перемешивании. Таким образом, криогели ПВС наряду с макропористостью удовлетворяют и требованию операционной стабильности. И, наконец, криогели ПВС могут, в случае необходимости, подвергаться стерилизации, например, промывке дезинфицирующими растворами, облучению или (для уничтожения отработанного материала) автоклавированию.

Способ осуществляют следующим образом: вирусосодержащую жидкость инкубируют с биоаффинным сорбентом, содержащим специфические антитела, иммобилизованные на активированной матрице криогеля ПВС, отмывают несвязавшиеся посторонние компоненты и освобождают адсорбированный вирус из комплекса с биоаффинным сорбентом. Для модификации вируса используют биоаффинный сорбент, содержащий соиммобилизованные специфические антитела и фермент (ферменты), способные вызвать модификацию вирусных частиц. Конкретная реализация предлагаемого изобретения иллюстрируется следующими примерами:

Пример 1.

Для концентрирования вируса гриппа (тип А, H1N1, размер вирусных частиц 0,1 мкм) используют биоаффинный сорбент, представляющий собой криогель ПВС с максимальным диаметром пор 1,0 мкм, активированный глутаровым альдегидом при pH 1,0, к которому ковалентно пришиты специфические антитела, полученные из сыворотки крови кроликов, иммунизированных соответствующим антигеном (емкость сорбента по иммобилизованным антителам 0,7 - 1,2 мг/г). Навеску (0,5 г) биоаффинного сорбента перемешивают с 2,0 мл вирусосодержащей жидкостью в течение 20 часов при +5°C, затем промывают несвязавшиеся компоненты 0,1M PBS (контроль - нулевые значения оптической плотности при 260 нм и 280 нм, а также отрицательная реакция гемагглютинации (РГА)), и далее проводят десорбцию вируса 0,65 NaCl в 0,05M трис-HCl (pH 7,4) порциями по 1,0 мл в течение трех часов до полного удаления вируса. Емкость биоаффинного сорбента по десорбированному антигену - 1400 ГАЕ/г носителя. (ГАЕ - произведение обратного титра на объем пробы). Специфичность полученного биоаффинного сорбента (с иммобилизованными антителами к вирусу гриппа А, H1N1) проверяют с помощью вируса гриппа А, H3N2. Антигенную активность определяют по реакции прямой гемагглютинации (РГА). Полученные результаты показывают, что на данном иммуносорбенте неспецифические антигены (H3N2) не сорбируются, т.е. наблюдается только биоспецифическая сорбция (концентрирование) антигенов.

Пример 2.

Для концентрирования вируса гриппа (тип А, H1N1, размер вирусных частиц 0,1 мкм)

используют биоаффинный сорбент, представляющий собой криогель ПВС с максимальным диаметром пор 0,5 мкм, активированный эпихлоргидрином при pH 13, к которому ковалентно пришиты специфические антитела, полученные из сыворотки крови кроликов, иммунизированных соответствующим антигеном (емкость сорбента по иммобилизованным антителам 0,5 - 0,6 мг/г), а элюцию сконцентрированного вируса осуществляют в колоночном режиме с использованием 2,5M MgCl₂ в 0,05M трис-HCl (pH 7,4). Количество десорбированного вируса составляет 800 ГАЕ/г носителя.

Пример 3.

Для концентрирования вируса гриппа (тип А, H3N2, размер вирусных частиц 0,12 мкм) используют биоаффинный сорбент, представляющий собой криогель ПВС с максимальным диаметром пор 0,7 мкм, активированный бромцианом при pH 11,5, к которому ковалентно пришиты специфические антитела, полученные из сыворотки крови кроликов, иммунизированных соответствующим антигеном (емкость сорбента по иммобилизованным антителам 1,5 мг/г), а элюцию сконцентрированного вируса проводят с помощью 0,65 M NaCl в 0,5M трис-HCl (pH 7,4). Количество десорбированного вируса составляет 2000 ГАЕ/г носителя.

Пример 4.

Для концентрирования вируса парагриппа ГП₆ (размер вирусных частиц 0,15 мкм) используют биоаффинный сорбент, представляющий собой криогель ПВС с максимальным диаметром пор 1,5 мкм, активированный глутаровым альдегидом при pH 0,5, к которому ковалентно пришиты специфические антитела, полученные из сыворотки крови морских свинок, иммунизированных соответствующим антигеном (емкость сорбента по иммобилизованным антителам 0,5 - 0,7 мг/г), а элюцию сконцентрированного вируса проводят с помощью 0,65 NaCl в 0,05M трис-HCl (pH 7,4). Титр очищенного антигена (вирус парагриппа ГП₆) определяют методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА). Емкость биоаффинного сорбента в отношении данного вируса составляет 1266 единиц антигенной активности на 1 г носителя.

Пример 5.

Для концентрирования вируса оспы (размер вирусных частиц 0,4 x 0,2 мкм) используют биоаффинный сорбент, представляющий собой криогель ПАВ с максимальным диаметром пор до 2 мкм, активированный глутаровым альдегидом при pH 1,2, к которому ковалентно пришиты специфические антитела, полученные из сыворотки крови кроликов, иммунизированных соответствующим антигеном (емкость сорбента по иммобилизованным антителам 0,8 мг/г), а элюцию сконцентрированного вируса проводят с помощью 0,75 NaCl в 0,05 трис-HCl (pH 7,8). Титр очищенного антигена (вирус оспы) определяют в непрямом варианте ИФА. Емкость биоаффинного сорбента в отношении данного вируса

составляет 2048 единиц антигенной активности на 1 г носителя.

Пример 6.

Для концентрирования и ферментативной модификации вируса ящура (размер вирусных частиц 0,02 мкм) навеску (0,5 г) биоаффинного сорбента, представляющего собой криогель ПВС с максимальным диаметром пор до 0,04 мкм, активированный глутаровым альдегидом при pH 1,0, к которому ковалентно пришиты специфические антитела к вирусу ящура (получены из сыворотки крови телят, иммунизированных соответствующим антигеном) и модифицирующий фермент - папаин (емкость сорбента по иммобилизованным антителам - 0,4 мг/г, по папаину - 0,2 мг/г) перемешивают с 2,0 мл вирусосодержащей жидкости в течение 12 часов при +5°C. Аналогичным образом поступают с контрольным биоаффинным сорбентом, у которого иммобилизованный папаин содержит блокированную тиольную группу активного центра. Далее проводят десорбцию вируса 0,5M NaCl в 0,05M трис-HCl (pH 7,4) порциями по 1,0 мл в течение трех часов. Емкость контрольного биоаффинного сорбента по десорбированному вирусу составляет 780 БОЕ/г носителя (БОЕ - бляшкообразующие единицы), носителя с активным папаином - 32 БОЕ/г носителя, т.е. в 24,3 раза меньше, что является результатом действия иммобилизованной протеазы на вирус ящура, сконцентрированный в фазе биоаффинного сорбента за счет взаимодействия с иммобилизованными антителами (факт подобного концентрирования доказывают результаты эксперимента с контрольным биоаффинным сорбентом), что в итоге приводит к значительному снижению вирулентной активности вируса.

Пример 7.

Для концентрирования и ферментативной модификации вируса паротита (размер вирусных частиц 0,14 мкм) навеску (0,5 г) биоаффинного сорбента, представляющего собой криогель ПВС с максимальным диаметром пор до 1,4 мкм, активированный глутаровым альдегидом при pH 1,0, к которому ковалентно пришиты специфические антитела к вирусу паротита (получены из сыворотки крови хомяков, иммунизированных соответствующим антигеном) и модифицирующие ферменты - нейраминидазу и рибонуклеазу (емкость сорбента по иммобилизованным антителам - 0,3 мг/г, по нейраминидазе - 0,15 мг/г, по РНК-азе 0,2 мг/г), инкубируют с 2,0 мл вирусосодержащей жидкости в течение 12 часов при +5°C. Аналогичным образом поступают с контрольным биоаффинным сорбентом, представляющим собой препарат, в котором иммобилизованы на носителе только антитела, специфические к вирусу паротита (емкость контрольного биоаффинного сорбента по антителам - 0,7 мг/г носителя). Затем отмывают несвязавшиеся компоненты 0,1M PBS (контроль - нулевые значения оптической плотности при 280 и 260 нм) и далее проводят десорбцию вируса 0,5 NaCl в 0,05M трис-HCl (pH 7,4) порциями по 1,0 мл в течение трех часов. Емкость контрольного биоаффинного сорбента по десорбированному вирусу

составляет 650 ГАЕ/г носителя, для сорбента с модифицирующими ферментами вирусологической активности не зафиксировано, что связано с действием иммобилизованной нейраминидазы на белковый капсид вируса паротита и последующего воздействия иммобилизованной РНК-азы на освобождающуюся из вириона рибонуклеиновую кислоту, результатом чего является отсутствие вирулентной активности вируса.

Предлагаемый способ концентрирования вируса обладает следующими преимуществами по сравнению с аналогами и прототипом:

- 15 - повышена эффективность способа, т.к. в противоположность способам-аналогам в заявляемом способе применяется биоаффинный сорбент на основе вязкоупругого нехрупкого и гидролитически стабильного криогеля ПВС, поэтому
- 20 появляется возможность проводить концентрирование вируса не только в хроматографическом (колоночном) варианте, но и в реакторах с перемешиванием сорбента, что существенно интенсифицирует массообменные процессы, т.е. улучшается технологичность способа;
- 25 - повышена универсальность способа, т.к. обеспечивается возможность концентрирования, наряду с мелкими, даже самых крупных вирусов (0,5 мкм и более), в то время как в способе-прототипе матрица биоаффинного носителя способна обеспечить диффузию внутрь его гранул лишь довольно мелких (до 0,08 мкм) вирусов; кроме того, универсальность заявляемого способа также обусловлена возможностью одновременного
- 30 концентрирования и ферментативной модификацией вируса, когда биоаффинный сорбент наряду с иммобилизованными антителами содержит иммобилизованный модифицирующий фермент (ферменты);
- 35 - биоаффинные сорбенты на основе криогеля ПВС инертны и высокоспецифичны, их можно повторно применять без существенной специфической активности, полимер, используемый для приготовления гелевой основы дешев и доступен.

Литература

- 45 1. Х.Френкель-Конрат. Химия и биология вирусов.// М.,1972, стр. 33-37.
- 2. Я.Туркова, Аффинная хроматография,//М.,1980, стр. 5-14.
- 3. Purification of measles virus by affinity chromatography and by ultracentrifugation: a comparative study//Njayou M., Quash G.// J. Virol. Meth. - 1991, v. 32, N 1, p/67-77.
- 50 4. Separation and purification of biopolymers by affinity chromatography on controlled-pore silica gel./Colpan M.//Ger. Offen. DE 3627063, cl. B 01 D 15/08, 1988.
- 55 5. Separation and purification of antigen for diagnosis of infectious bursa disease in chickens. Nagai Sh., Otaki Y., Ueda S., JP 63210775, cl. G 01 N 33/569, 1989.
- 60 6. Применение криогелей поливинилового спирта в биотехнологии. Обзор литературных данных. //Лозинский В.И., Вакула А.В., Зубов А.Л.// Биотехнология, N 4, 1992, с. 5-14.

Формула изобретения:

- 1. Способ концентрирования вируса, включающий его связывание биоаффинным

RU 2130069 C1

сорбентом, содержащим антитела к вирусу, иммобилизованные на полимерной основе, промывку и последующую десорбцию, отличающийся тем, что в качестве полимерной основы биоаффинного сорбента используют криогель поливинилового спирта

5

с размером пор 0,04 - 2,0 мкм.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что связывание вируса осуществляют с помощью биоаффинного сорбента, содержащего, наряду с антителами, иммобилизованные ферменты, модифицирующие вирус.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

RU 2130069 C1